

09/744328

PCT/JP99/04238

06.12.99

JP99/4238

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 8月 6日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第233499号

出願人

Applicant(s):

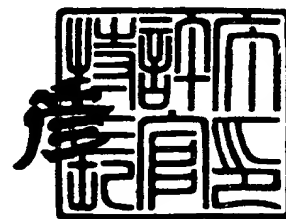
帝人株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-307978

【書類名】 特許願

【整理番号】 P31857

【提出日】 平成10年 8月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C251/00

【発明の名称】 糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用医薬組成物

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内

【氏名】 佐々木 聡

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内

【氏名】 鷲見 芳彦

【特許出願人】

【識別番号】 000003001

【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代表者】 安居 祥策

【代理人】

【識別番号】 100077263

【弁理士】

【氏名又は名称】 前田 純博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010250

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特平 1 0 - 2 3 3 4 9 9

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701951

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質を有効成分とする糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の医薬組成物。

【請求項 2】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質が、抗ガレクチン-3 抗体である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質が、ガレクチン-3 結合阻害剤である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 4】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質が、ガレクチン-3 の細胞内への取り込みを調節する化合物である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 5】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質が、ガレクチン-3 の核への輸送を調節する化合物である請求項 1 記載医薬組成物。

【請求項 6】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質が、ガレクチン-3 の核内あるいは細胞質内での生理活性を調節する化合物である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 7】 ガレクチン-3 の作用を調節する物質が、ガレクチン-3 の発現あるいは分泌を調節する化合物である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 8】 請求項 1～7 いずれか 1 項記載の医薬組成物と製薬学的に許容される担体とからなる治療薬または予防薬。

【請求項 9】 糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症が、メサンギウム細胞の異常増殖に由来する糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症である請求項 1～7 いずれか 1 項記載の医薬組成物。

【請求項 10】 糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症が、メサンギウム細胞の異常増殖に由来する糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症である請求項 8 記載の治療薬または予防薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ガレクチン-3の作用を調節する物質を有効成分とする糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の医薬組成物、およびそれからなる予防剤または治療剤に関するものである。

【0002】

【従来技術】

ガレクチン-3は $\beta$ -galactoside-binding protein ファミリーに属する分子量約30Kdのタンパク質で、組織中の細胞表面、細胞質、核に広く分布するレクチンの一種である（例えば、Barondes, S.H., et al. J. Biol. Chem. (1994) 269: 20807-20810、Hughes, R. C. Glycobiology (1994) 4:5-12、Wang, L. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1995) 217:292-303など参照）。ガレクチン-3は細胞表面あるいは細胞外基質(ECM)に存在する糖タンパク質の適当な糖鎖部分と結合し、好中球、好塩基球、あるいはマクロファージなどの炎症性細胞を活性化したり、それらの細胞からのサイトカインの産生を促進したりすることや（例えば、Sato, S. et al. J. Biol. Chem. (1994a) 269:4424-4430、Liu, F. T. Immunol. Today(1993)14:486-490など参照）、その過剰発現がT細胞のアポトーシス死を抑制すること（Yang, R-Y H. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA(1996)93:6737-6742参照）が知られており、炎症および免疫反応を担う重要なタンパク質と考えられる。

【0003】

更に、ガレクチン-3は、X線照射誘起ラット肺損傷モデルで、損傷修復期に高発現が見られることや（Kasper, M. et al. J. Pathol. (1996) 179:309-316参照）、発生期の人腎組織形成に重要な役割を果たしている可能性があること（Winyard, P. J. D. et al. J. Am. Soc. Nephrol. (1997) 8:1647-1657参照）など、組織の形成および修復にも重要な役割を果たしていることが知られている。

【0004】

糸球体腎炎もしくは糖尿病性腎症もしくは組織線維症は、いずれもコラーゲン

などのECMの過剰産生と蓄積が病態形成に重要な要因となる疾患である。また、糸球体腎炎では、ECMの産生細胞の一種であるメサンギウム細胞の異常増殖も病態形成の重要な要因と考えられている。現在これらの疾患に対しては、副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制剤、抗血小板薬、ACE阻害剤などが用いられているが、ECMの過剰産生や蓄積に対して優れた薬効を示す薬剤はなく、新たな作用機序を有する薬剤が強く求められている。

【0005】

ガレクチン-3は、肺線維症のモデルであるX線照射誘起ラット肺損傷モデルで、組織損傷部位に高発現が見られてはいるが、コラーゲンなどのECMの過剰産生と蓄積、およびECM産生細胞の一種であるメサンギウム細胞の生存を制御しうるか否かは明らかにされていない。従って、ガレクチン-3の作用を調節することが、糸球体腎炎もしくは糖尿病性腎症もしくは組織線維症の治療および／または予防上有用であるかは知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ガレクチン-3の作用を調節する物質を有効成分とする糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の医薬組成物を提供することである。更に、本発明の目的は、上記医薬組成物と製薬学的に許容される担体とからなる治療薬または予防薬を提供することである。ことに、本発明の目的は、これまで既存薬では有効なものがない、コラーゲンなどのECMの過剰産生と蓄積を制御しうる治療または予防薬を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

このような従来技術に鑑みて、本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、ガレクチン-3がコラーゲンなどのECMの過剰産生と蓄積を制御しうる分子であること、およびECM産生細胞の一種であるメサンギウム細胞の生存を制御しうる分子であることを知見すると共に、ガレクチン-3の作用を調節する物質がコラーゲンなどのECMの過剰産生と蓄積を制御しうることを知見し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明はガレクチン-3の作用を調節する物質を有効成分とする糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の医薬組成物、および該医薬組成物と製薬学的に許容される担体とからなる治療薬または予防薬である。

【0009】

これは、ガレクチン-3の作用を調節する物質が、糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症の治療薬または予防薬たり得ることを示すものである。

【0010】

本発明において用いられるガレクチン-3の作用を調節する薬剤としては、例えば、以下のものが挙げられる。

【0011】

(1) 抗ガレクチン-3抗体；マウス抗ガレクチン-3モノクローナル抗体（例えば、Lui, F.T., et al., J. Biol. Chem. (1996) 35:6073-6079に記載の抗体）

(2) ガレクチン-3結合阻害剤；Lacto-N-tetraose、lacto-N-fucopentaose、paralacto-N-Hexaose、血液型A,B,B様糖鎖などガレクチン-3が結合可能な糖鎖、または上記糖鎖を含む糖脂質、あるいは、フェツイン、アシアロフェツイン、ラミニン、フィブロネクチン、CD11bなど、ガレクチン-3が結合可能な糖鎖を分子表面に有する糖タンパク質、またはそれらの断片。（例えば、Feizi, T. et al., Biochemistry (1994) 33:6342-6349、Sato, S., et al., J. Biol. Chem. (1992) 267:6983-6990参照）。ガレクチン-3とガレクチン-3が結合可能な糖鎖との結合を阻害する物質あるいは抗体。

【0012】

(3) ガレクチン-3の細胞内への取り込みを調節する物質；ガレクチン-3レセプターあるいはガレクチン-3レセプター保有細胞に作用してガレクチン-3の作用を調節するもの、例えばガレクチン-3レセプター拮抗剤、あるいは抗ガレクチン-3レセプター抗体。AGEまたはAGEレセプターまたはそれらの断片（VIassara, H. et al., Molecular Medicine (1995) 1:634-646など参照）。

【0013】

(4) ガレクチン-3の核への輸送を調節する化合物；ガレクチン-3トランス

ポータータンパク質の阻害剤。

【0014】

(5) ガレクチン-3の核内あるいは細胞質内での生理活性を調節する物質；ガレクチン-3と核内あるいは細胞質内で結合するガレクチン-3結合タンパク質あるいは核酸の誘導体もしくは断片、またはそれらの結合を調節する物質。

【0015】

(6) ガレクチン-3の発現あるいは分泌を調節する物質；ガレクチン-3遺伝子のアンチセンス。ガレクチン-3遺伝子のプロモーター領域の機能を調節する物質。ブレフェルジンAのような細胞内でのタンパク質の輸送を調節する物質。

【0016】

本発明で用いられるガレクチン-3の作用を調節する物質は、その自体を有効成分とし、該物質と製薬学的に許容される担体を配合することによって糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の医薬組成物とすることができる。更に、該医薬組成物と製薬学的に許容される担体とからなる治療薬または予防薬とすることができる。

【0017】

また、上記糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症は、メサンギウム細胞の異常増殖に由来する糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症であることが好ましい。

【0018】

ここで、製薬学的に許容される担体としては、後記賦形剤と同様のものをあげることができる。この場合のガレクチン-3の作用を調節する物質と担体との配合量については、後記のように活性成分の投与量に従うが、特に限定されず、広範囲に選択され、通常ガレクチン-3の作用を調節する物質は全組成物中1～70重量%、好ましくは5～50重量%である。

【0019】

得られた組成物は、更に公知の方法で適当な賦形剤等を用いて軟カプセル剤、硬カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤等の経口剤、注射剤、坐剤、または外用剤として提供される。



## 【0020】

かかる賦形剤としては、植物油（例えばトウモロコシ油、綿実油、ココナッツ油、アーモンド油、落花生油、オリーブ油等）、中鎖脂肪酸グリセライド油等の油状エステル、鉱物油、トリカプリリン、トリアセチン等のグリセリンエステル類、エタノール等のアルコール類、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、動物油脂、セルロース誘導体（結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン、デキストリン、乳糖、マンニトール、ソルビトール、デンプン等があげられる。

## 【0021】

活性成分の投与量は、疾患の程度、患者の年齢等にもよるが、一日につき一人当たり0.01mgから1000mg程度で、好ましくは一日につき一人当たり1mgから200mgであり、このような条件を満足するように製剤するのが好ましい。

## 【0022】

## 【実施例】

以下に実施例を示し本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【0023】

## [実施例1]

抗Thy-1.1抗体誘起ラット腎炎モデルでのガレクチン-3の発現変動

ウサギ抗Thy-1.1血清は、ラット胸腺細胞より精製したThy-1.1抗原を、ウサギ背部皮下に免疫することにより得た。抗Thy-1.1抗体誘起ラット腎炎モデルはOkudaらの方法 (Okuda S., et al. J. Clin. Invest. (1990) 86:453-462) に準じて、リン酸緩衝生理食塩水で2倍希釈した上記のウサギ抗Thy-1.1血清0.25mlを正常ウサギ補体 (Sigma) 0.25mlと共に、Sprague-Dawleyラットに尾静注することにより作成した。ラットは、抗体投与後3, 7, 14日後に屠殺し、それぞれのラットから腎臓をリン酸緩衝生理食塩水で灌流後摘出した。摘出した腎臓は、4%(w/v) リン酸緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、抗体染色用組織切片を作成した。組織切片の抗体染色は、一次抗体にアフィニティー精製したウサギ抗ガレク

チン-3抗体を、二次抗体にパーオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギ抗体(Sigma)を使用し、発色基質にはDAB(Sigma:DAB Tablet)を使用することにより行った。

## 【0024】

組織切片の抗体染色の結果を図1に示した。抗Thy-1.1抗体を投与しないラットにおいては、ガレクチン-3は遠位尿細管のApical表面にのみ局在するが、抗Thy-1.1抗体を投与したラットにおいては、抗体投与後3日目に遠位尿細管細胞質に存在が見られ、また抗体投与後7,14日目には糸球体にも存在が認められることが確認された。この知見により、ガレクチン-3は、抗Thy-1.1抗体誘起ラット腎炎モデルにおいて、病態形成初期に発現が上昇することが確認された。

## 【0025】

## [実施例2]

ガレクチン-3のラットメサンギウム細胞に対する細胞死抑制作用

ラットメサンギウム細胞は、Strikerらの方法(Striker, G. E., et al., Lab. Invest. (1985) 53:123-128) に準じて、Sprague-Dawleyラットより分離した。分離したラットメサンギウム細胞は10%ウシ胎仔血清を添加した基本培地(60  $\mu$ g/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むDMEM/F12 (1:1) 培地、Gibco BRL社製)を用いて96穴プレート上の各ウェル内で、5%CO<sub>2</sub>存在下37℃で培養した。Semi-confluentな状態にまで達した培養ラットメサンギウム細胞は、基本培地で洗浄後、0.1%ウシ血清アルブミン(Sigma)を添加した基本培地中で2日間培養した後、0または50  $\mu$ g/mlのガレクチン-3および0または0.4ng/mlのTGF- $\beta$ を含む0.1%ウシ血清アルブミン(Sigma)を添加した基本培地中で更に1日から4日間培養した。ガレクチン-3およびTGF- $\beta$ 添加後1,2,3,4日目に、それぞれ各ウェル内で生存する培養ラットメサンギウム細胞量を、生細胞によるMTS tetrazolium (Promega社製CellTiter 96 Aqueous one solution) からformazanへの転換を指標として測定した。

## 【0026】

結果を図2に示した。ガレクチン-3は、TGF- $\beta$ 存在・非存在の両条件下において、ECM産生細胞の一種であるラットメサンギウム細胞の細胞死を抑制することが確認された。

【0027】

## 〔実施例3〕

ガレクチン-3のラットメサンギウム細胞に対するコラーゲンタイプIV産生促進作用

ラットメサンギウム細胞は実施例2と同様に分離した。分離したラットメサンギウム細胞は10%ウシ胎仔血清を添加した基本培地(60 $\mu$ g/mlペニシリン、100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むDMEM/F12(1:1)培地、Gibco BRL社製)を用いて96穴プレート上の各ウェル内で、5%CO<sub>2</sub>存在下37℃で培養した。Confluentな状態にまで達した培養ラットメサンギウム細胞は、基本培地で洗浄後、0.1%ウシ血清アルブミン(Sigma)を添加した基本培地中で2日間培養した後、0、10または30 $\mu$ g/mlのガレクチン-3および0、0.1、0.4または1.6ng/mlのTGF- $\beta$ を含む0.1%ウシ血清アルブミン(Sigma)を添加した基本培地中で更に3日間培養した。ガレクチン-3およびTGF- $\beta$ 添加後3日目に、各ウェルの培養液中に蓄積されたタイプIVコラーゲンの量を、ヤギ抗タイプIVコラーゲン抗体(Chemicon)を固相抗体に、ビオチン標識ヤギ抗タイプIVコラーゲン抗体(Chemicon)を一次抗体に使用したサンドイッチELISA法を用いて測定した。得られた各ウェルの培養液中のタイプIVコラーゲン量は、実施例2で述べた方法と同様にして測定した各ウェル中の生細胞量で除することにより標準化した。

【0028】

結果を図3に示した。ガレクチン-3は、TGF- $\beta$ と同様に且つTGF- $\beta$ の効果と相加的に、ECM産生細胞の一種であるラットメサンギウム細胞からの、コラーゲンの一種であるタイプIVコラーゲンの産生・蓄積を促進することが確認された。

【0029】

## 〔実施例4〕

ガレクチン-3結合阻害タンパク質による、ガレクチン-3のラットメサンギウム細胞に対するコラーゲンタイプIV産生促進作用の抑制

ラットメサンギウム細胞は実施例2と同様に分離した。分離したラットメサンギウム細胞は10%ウシ胎仔血清を添加した基本培地(60 $\mu$ g/mlペニシリン、10

0  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含むDMEM/F12 (1:1) 培地、Gibco BRL社製) を用いて96穴プレート上の各ウェル内で、5%CO<sub>2</sub>存在下37℃で培養した。Confluentな状態にまで達した培養ラットメサングウム細胞は、基本培地で洗浄後、0.1%ウシ血清アルブミン (Sigma) を添加した基本培地中で2日間培養した後、10  $\mu$ g/ml のガレクチン-3 およびガレクチン-3 の結合を阻害する物質の一つとして知られているフェツイン糖タンパク (例えばSato, S. et al., J. Biol. Chem (1992) 267:6983-6990 参照) を0、0.1、0.2、0.5 または1.5mg/ml 含む0.1%ウシ血清アルブミン (Sigma) を添加した基本培地中で更に4日間培養した。ガレクチン-3 およびフェツイン添加後4日目に、各ウェルの培養液中に蓄積されたタイプIVコラーゲンの量を、ヤギ抗タイプIVコラーゲン抗体 (Chemicon) を固相抗体に、ビオチン標識ヤギ抗タイプIVコラーゲン抗体 (Chemicon) を一次抗体に使用したサンドイッチELISA法を用いて測定した。得られた各ウェルの培養液中のタイプIVコラーゲン量は、実施例2で述べた方法と同様にして測定した各ウェル中の生細胞量で除することにより標準化した。

## 【0030】

結果を図4に示した。ガレクチン-3の結合を制御する物質が、ガレクチン-3の添加によるECM産生細胞の一種であるラットメサングウム細胞からの、コラーゲンの一種であるタイプIVコラーゲンの産生・蓄積の促進を、抑制することが確認された。

## 【0031】

以上の実施例より、ガレクチン-3は、メサングウム増殖性糸球体腎炎の動物モデルである抗Thy-1.1抗体誘起ラット腎炎において、病態形成初期に発現が上昇すること (実施例1)、またECM産生細胞の一種であるメサングウム細胞の細胞死を抑制すること (実施例2)、およびECM産生細胞からのコラーゲンの産生・蓄積を促進すること (実施例3) が明らかとなり、また、ガレクチン-3の作用を制御する物質が、ガレクチン-3によるECM産生細胞からのコラーゲンの産生・蓄積の促進を抑制すること (実施例4) が明らかとなった。

【0032】

【発明の効果】

すなわち、ガレクチン-3の作用を調節する物質を有効成分とする医薬組成物が、糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の予防剤または治療剤として臨床応用可能であることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

抗Thy-1.1抗体誘起ラット腎炎モデルでのガレクチン-3の発現変動を示したものである。

A: 抗Thy-1.1抗体を投与していないラットの腎臓、B: 抗Thy-1.1抗体投与後3日目、C: 抗Thy-1.1抗体投与後7日目、D: 抗Thy-1.1抗体投与後14日目

図中の星印はマクラデンサ領域を、mはメサンギウム領域を、cは半月体形成領域を、黒塗りの矢尻は遠位尿細管のアピカル側を、黒塗りの矢印は遠位尿細管細胞質を、白抜きの矢印は遠位尿細管内の内包物をそれぞれ表わす。

【図2】

ガレクチン-3のラットメサンギウム細胞に対する細胞死抑制作用を示したものである。

【図3】

ガレクチン-3のラットメサンギウム細胞に対するコラーゲンタイプIV産生促進作用を示したものである。

【図4】

ガレクチン-3結合阻害タンパク質による、ガレクチン-3のラットメサンギウム細胞に対するコラーゲンタイプIV産生促進作用の抑制を示したものである。

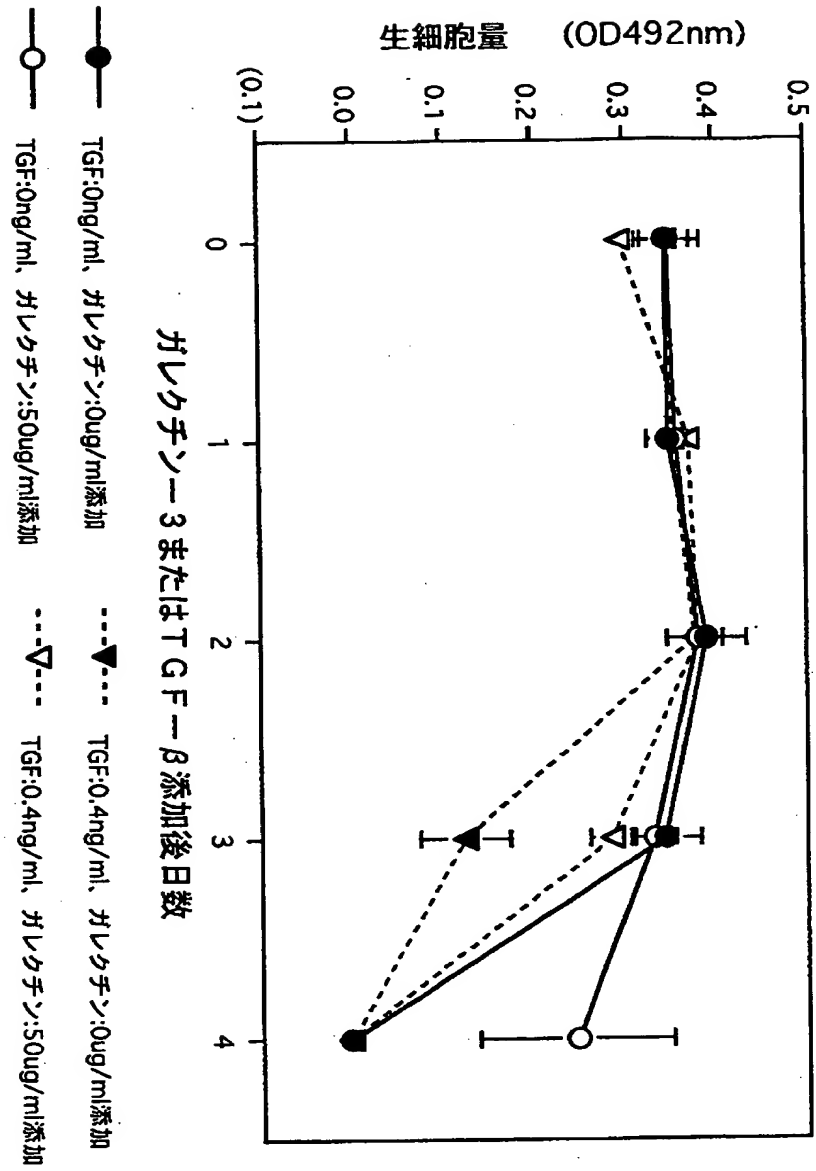
【書類名】

図面

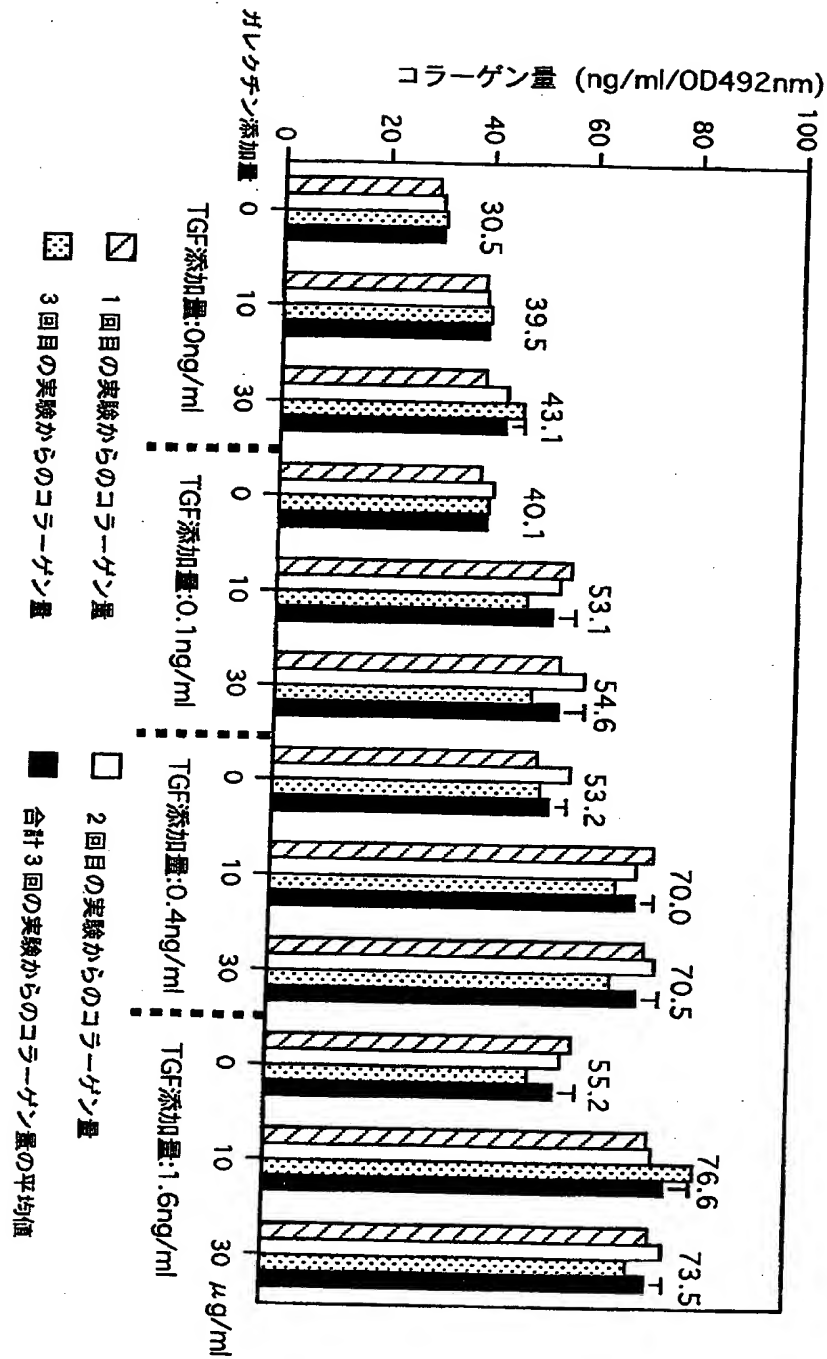
【図 1】



【図 2】

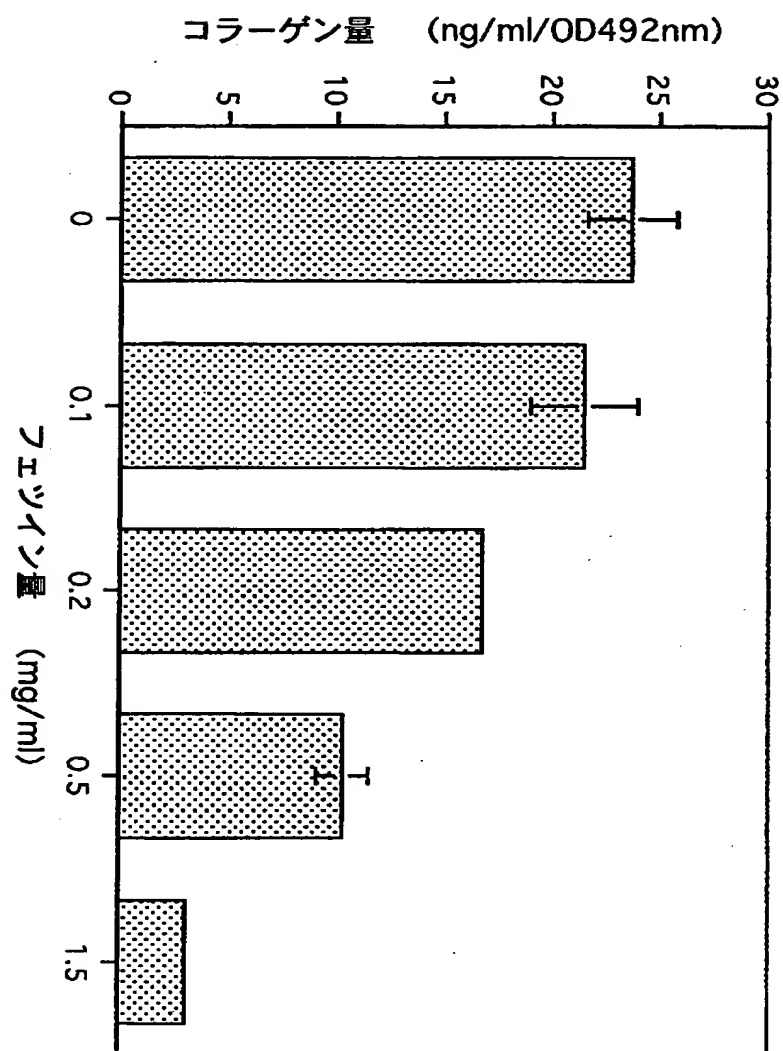


【図3】





【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 臨床応用可能な糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症の予防薬または治療薬となり得る医薬組成物を提供することである。

【解決手段】 ガレクチン-3の作用を調節する物質を有効成分とする糸球体腎炎、糖尿病性腎症もしくは組織線維症用の医薬組成物。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000003001  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号  
【氏名又は名称】 帝人株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100077263  
【住所又は居所】 東京都千代田区内幸町2-1-1 飯野ビル 帝人  
株式会社内  
【氏名又は名称】 前田 純博

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003001]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
氏 名	帝人株式会社